

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/49 C07K14/16 A61K39/12 A61K39/21 C12N15/85
C12N1/21 C12N5/10 A61P31/18 A61P31/12

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07K A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

MEDLINE, AIDSLINE, CANCERLIT, LIFESCIENCES, EMBASE, CHEM ABS Data, SCISEARCH, BIOSIS, WPI Data, EPO-Internal, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>US 5 846 546 A (HURWITZ JULIA ET AL) 8. Dezember 1998 (1998-12-08)</p> <p>Ansprüche Spalte 24, Zeile 12 -Spalte 25, Zeile 38 Spalte 28, Zeile 12-37 --- -/--</p>	<p>1-10, 16-18, 23-27, 30-37, 40-46, 49-51</p>



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

18. August 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

01/09/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Covone, M

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>WO 95 04147 A (CHIRON CORP) 9. Februar 1995 (1995-02-09)</p> <p>Seite 3, Zeile 10-23 Seite 4, Zeile 13-21 Seite 26, Zeile 7-17 Ansprüche</p>	<p>1,5,6, 16-18, 23,26, 27,30, 35-37, 40-46, 49-51</p>
X	<p>NEURATH A R ET AL: "Antibody responses of chimpanzees immunized with synthetic peptides corresponding to full-length V3 hypervariable loops of HIV-1 envelope glycoproteins." AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES, (1991 OCT) 7 (10) 813-23. , XP000938405 Abbildungen 1,2 Zusammenfassung</p>	<p>1,5,44, 46,51</p>
X	<p>FR 2 677 363 A (PASTEUR INSTITUT ;PASTEUR INSTITUT (FR); INST NAT SANTE RECH MED () 11. Dezember 1992 (1992-12-11) Seite 4, Zeile 2 -Seite 5, Zeile 12 Seite 7, Absatz 2 Ansprüche</p>	<p>1-5, 23-25, 44,45,51</p>
A	<p>SCHREIBER M ET AL: "The V3 -directed immune response in natural human immunodeficiency virus type 1 infection is predominantly directed against a variable, discontinuous epitope presented by the gp120 V3 domain." JOURNAL OF VIROLOGY, (1997 DEC) 71 (12) 9198-205. , XP002145193 das ganze Dokument</p>	<p>1-52</p>
A	<p>FOMSGAARD A: "HIV-1 DNA vaccines." IMMUNOLOGY LETTERS, (1999 JAN) 65 (1-2) 127-31. REF: 36 , XP000857026 das ganze Dokument</p>	<p>1-52</p>
A	<p>EP 0 327 180 A (MICROGENESYS INC) 9. August 1989 (1989-08-09) seq.ID 8 98,2% identity with seq.ID 1 and 9</p>	<p>11-13,39</p>
A	<p>US 5 851 813 A (DESROSIERS RONALD C) 22. Dezember 1998 (1998-12-22) seq.ID 5 100% overlap with seq.ID 1</p>	<p>11-13,39</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/09759

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5846546	A	08-12-1998	US 5741492 A	21-04-1998
			US 6086891 A	11-07-2000
			AU 709174 B	26-08-1999
			AU 1829997 A	20-08-1997
			BG 102712 A	30-04-1999
			BR 9707611 A	27-07-1999
			CA 2243570 A	31-07-1997
			CN 1214083 A	14-04-1999
			CZ 9802293 A	16-12-1998
			EP 0876498 A	11-11-1998
			HU 9900389 A	28-06-1999
			JP 2000504326 T	11-04-2000
			NO 983377 A	23-09-1998
			PL 328193 A	18-01-1999
			WO 9727311 A	31-07-1997
WO 9504147	A	09-02-1995	AU 6829494 A	28-02-1995
FR 2677363	A	11-12-1992	NONE	
EP 0327180	A	09-08-1989	AU 2520692 A	17-12-1992
			AU 632039 B	17-12-1992
			AU 2955789 A	03-08-1989
			BR 8900515 A	03-10-1989
			JP 2203793 A	13-08-1990
			LT 1795 A	25-08-1995
			LV 10497 A,B	20-02-1995
			ZA 8900862 A	25-10-1989
US 5851813	A	22-12-1998	AT 147782 T	15-02-1997
			DE 69124215 D	27-02-1997
			DE 69124215 T	07-08-1997
			EP 0491930 A	01-07-1992
			JP 5501654 T	02-04-1993
			WO 9200987 A	23-01-1992

INTERNET COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
 US Department of Commerce
 United States Patent and Trademark
 Office, PCT
 2011 South Clark Place Room
 CP2/5C24
 Arlington, VA 22202
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE
 in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 16 November 2000 (16.11.00)	
International application No. PCT/EP99/09759	Applicant's or agent's file reference P 52348
International filing date (day/month/year) 03 December 1999 (03.12.99)	Priority date (day/month/year) 12 February 1999 (12.02.99)
Applicant SCHREIBER, Michael	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

07 September 2000 (07.09.00)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Juan Cruz Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

16 T

em

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

REC'D 15 MAY 2001



WIPO PCT

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts P 52348	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/09759	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 03/12/1999	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 12/02/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N15/49		
Anmelder STRATHMANN AG & Co. et al.		

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 6 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
- ☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).
- Diese Anlagen umfassen insgesamt 9 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 07/09/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 11.05.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Stolz, B Tel. Nr. +49 89 2399 8416 

I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-61 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-54 eingegangen am 02/11/2000 mit Schreiben vom 02/11/2000

Zeichnungen, Blätter:

1/6-6/6 ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/09759

- ☐ Beschreibung, Seiten:
☐ Ansprüche, Nr.:
☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-18, 23-45, 47, 51-54
	Nein: Ansprüche	19-22, 46, 48-50
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1-8, 10-18, 23-45, 47, 51-54
	Nein: Ansprüche	9, 19-22, 46, 48-50
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-54
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:
siehe Beiblatt

1. Begründete Stellungnahme

1.1. Die Anmeldung beschreibt die Verwendung einer Mischung von Sequenzvarianten eines viralen Proteins zur Erzeugung neutralisierender Antikörper. Als Beispiel dienen die V2 und V3 Schleifen des gp120 Proteins von HIV.

1.2. Neuheit (Art. 33(2) PCT)

Der Anmeldung liegt die Idee zugrunde, viele unterschiedliche Sequenzvarianten eines viralen Proteins zu kombinieren um die z.B. bei HIV beobachtete Variabilität bestimmter antigener Determinanten zu imitieren.

Ein ähnliches Konzept wie das der vorliegenden Anmeldung zugrunde liegende wird auch in US 5846546 (D1) beschrieben. Darin werden Mischungen von bis zu 10^4 verschiedenen rekombinanten Vakziniaviren angestrebt, wobei jeder ein anderes HIV Env Protein exprimiert. Die Anmeldung beschreibt aber nicht nur auf Vakzinia basierende sogenannte polyenv Impfungen (Spalte 7), sondern auch DNS und Protein Vakzinen (Spalten 7 und 9). Bevorzugt enthalten die polyenv Vakzinen eine oder mehrere variable Regionen des Env Proteins (Spalte 25, Z. 28-32). Die Verwendung von Genkassetten zum Klonieren wird in Spalte 27 und 33 beschrieben. Die env Varianten werden aus Patientenseren erhalten. In einem Beispiel wurden 40 unterschiedliche env Sequenzen kombiniert.

Proteinvakzinen, die auf dem gleichen Prinzip basieren, sind auch in Neurath et al., 1991 (D2) beschrieben. Dabei wurde eine Vakzine mit 21 unterschiedlichen V3 Schleifenpeptiden von HIV an Schimpansen getestet.

Eine weitere Peptidvakzine, die auf dem gleichen Konzept basiert, wurde in FR 2677363 (D3, S. 2) beschrieben. Dabei wurden synthetisch hergestellte Peptide beschrieben, die aufgrund von in Patientenisolaten gefundenen V3 Schleifenpeptiden variiert werden. Dabei können bis zu 7×10^5 verschiedene Peptide gemischt werden (S. 7).

Die im Stand der Technik beschriebenen Kombinationen unterscheiden sich von

den in den Ansprüchen 1, 4, 23 und 30 definierten Vakzinen und Mischungen durch die Art der Erzeugung der Varianten. Im Stand der Technik ist für die V3 Schleife von HIV eine strukturelle Limitierung der möglichen Varianten beschrieben (z. B. Neurath et al., 1991, Einleitung; FR 2677363, S. 4 unten). Die Verteilung (siehe unten) der ausgetauschten Aminosäuren der im Stand der Technik zitierten Mischungen dürfte also, weil von natürlichen Isolaten ausgehend, nicht zufällig sein. Daher wird der Gegenstand der Ansprüche 1 bis 8, 23 bis 25, 30 bis 37, 41 bis 45, 47 sowie 51 bis 54 für neu gehalten.

Die in den Ansprüchen 9-18, 26 bis 29 und 38 bis 40 definierten Sequenzen sind im zitierten Stand der Technik nicht beschrieben.

Die Ansprüche 19 bis 22, 46 und 48 bis 50 beziehen sich auf generell definierte Mischungen von DNA Molekülen oder Proteinen, die mehrere Sequenzvarianten eines viralen Proteins beinhalten. Solche Mischungen und deren Verwendung sind im oben genannten Stand der Technik beschrieben.

1.3. Erfinderische Tätigkeit (Art. 33(3) PCT)

Ausgehend vom in D1 bis D3 beschriebenen Stand der Technik wird das zu lösende technische Problem in der Bereitstellung weiterer Vakzinen, die einen breiten Schutz gegen weitere Varianten eines bestimmten Virus gewähren, gesehen. Die Anmeldung löst dieses Problem durch zufällige Variation der z.B. in den Ansprüchen 13 und 14 definierten Nukleinsäuresequenzen. Dadurch werden im Gegensatz zum Stand der Technik auch Varianten erzeugt die in der Natur noch nicht gefunden wurden. Da der Stand der Technik von strukturellen Einschränkungen bei der Schaffung von Varianten ausging, lässt sich diese Lösung nicht in naheliegender Weise daraus ableiten.

Anspruch 9 bezieht sich auf von env abgeleitete Nukleinsäuren, die monovalente Restriktionsschnittstellen enthalten, die den spezifischen Austausch der V2 und V3 Regionen ermöglichen. WO95/04147 beschreibt ein ähnliches Konstrukt zum Austausch der V3 Region (p. 8, Zeilen 5-10). Die IPEA ist der Auffassung, dass falls der Fachmann den Austausch von V2 und V3 vorsieht, die in Anspruch 9 vorgeschlagene Lösung naheliegend ist.

2. Bestimmte Bemerkungen

- 2.1. Das abgrenzende Merkmal der unabhängigen Ansprüche 1, 4, 23 und 30 ist die Zufallsverteilung der Sequenzkombinationen. Um festzustellen ob eine Protein Vakzine eine solche Kombination enthält muss eine statistische Analyse durchgeführt werden, welche mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit behaftet ist. Die Frage ob eine Zufallsverteilung auch bei Gemischen mit beispielsweise 100, wie in D1 beschriebenen Sequenzvarianten, mit hinreichender Sicherheit ausgeschlossen werden kann, muss noch geklärt werden.
- 2.2. Anspruch 15 bezieht sich auf von env abgeleitete Sequenzen bei denen bestimmte Sequenzabschnitte ausgetauscht worden sind, um beispielsweise Nukleinsäuren auszutauschen. Ohne Angabe einer Referenzsequenz lässt sich nicht feststellen, ob ein solcher Austausch vorliegt.

Patentansprüche

1. Protein-Vakzine, die eine Mischung viraler Protein-Moleküle umfaßt, dadurch gekennzeichnet, daß die Moleküle Sequenzvarianten eines einzigen viralen Proteins oder eines Teils desselben sind, wobei die Mischung $\geq 10^2$ Sequenzvarianten enthält, die durch Expression einer Plasmid-DNA-Mischung erhältlich ist, die aufgrund der Variation von Nukleotidpositionen zufallsverteilte Sequenzkombinationen aufweist.
2. Protein-Vakzine nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Mischung $\geq 10^3$ und vorzugsweise $\geq 10^4$ Sequenzvarianten enthält.
3. Protein-Vakzine nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Mischung von GP120-Proteinen von HIV umfaßt, die sich jeweils in ihrer Aminosäuresequenz im Bereich der V2-Scheife und/oder der V3-Schleife voneinander unterscheiden.
4. DNA-Vakzine, die für eine Mischung strukturell unterschiedlicher Virus-Proteine kodiert, dadurch gekennzeichnet, daß die Vakzine eine Mischung von Sequenzvarianten eines viralen DNA-Moleküls oder eines Teils desselben enthält, wobei die Mischung $\geq 10^2$ DNA-Moleküle enthält, die sich in ihrer Nukleinsäuresequenz voneinander unterscheiden, wobei die Mischung aufgrund der Variation von Nukleotidpositionen zufallsverteilte Sequenzkombinationen aufweist.
5. DNA-Vakzine nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Mischung von DNA-Molekülen enthält, die Sequenzvarianten eines viralen Proteins oder eines Teils kodieren.
6. DNA-Vakzine nach Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Mischung $\geq 10^3$ und vorzugsweise $\geq 10^4$ DNA-Moleküle

- 2 -

enthält, die sich in ihrer Nukleinsäuresequenz voneinander unterscheiden.

7. DNA-Vakzine nach einem der Ansprüche 4 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß sie für eine Mischung strukturell unterschiedlicher GP120-Proteine von HIV kodiert, wobei die Vakzine eine Mischung von DNA Molekülen enthält, deren Nukleinsäuresequenzen sich in dem für die V2-Schleife kodierenden Bereich und/oder in dem für die V3-Schleife kodierenden Bereich voneinander unterscheiden.
8. DNA-Vakzine nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Mischung von DNA-Molekülen enthält, die sich in ihrer Nukleinsäuresequenz derart voneinander unterscheiden, daß sie für eine Mischung von GP120-Proteinen kodieren, die in der V2-Scheife und/oder in der V3-Schleife jeweils voneinander verschiedene Aminosäuresequenzen aufweisen.
9. Nukleinsäuresequenz, die von der in SEQ ID NO: 1 dargestellten *env*-Sequenz oder einem Fragment derselben abgeleitet ist, dadurch gekennzeichnet, daß sie derart modifiziert ist, daß sie monovalente Restriktionsspaltorte enthält, die den spezifischen Austausch der V2- und V3-Region ermöglichen.
10. Nukleinsäuresequenz, die von der in SEQ ID NO: 1 dargestellten *env*-Sequenz oder einem Fragment derselben abgeleitet ist, dadurch gekennzeichnet, daß sie derart modifiziert ist, daß sie zehn monovalente Restriktionschnittstellen in Abständen von ca. 150 Basenpaaren enthält.
11. Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Sequenz durch Einführen stiller Mutationen modifiziert ist.
12. Nukleinsäuresequenz nach den Ansprüchen 9 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß sie die in SEQ ID NO: 9 angegebene Sequenz aufweist.

- 3 -

13. Nukleinsäuresequenz, dadurch gekennzeichnet, daß sie die in SEQ ID NO: 11 angegebene Sequenz aufweist.
14. Nukleinsäuresequenz, dadurch gekennzeichnet, daß sie die in SEQ ID NO: 12 angegebene Sequenz aufweist.
15. Einzelsträngige Nukleinsäuresequenz, die den für die V3-Schleife und/oder den für die V2-Schleife von GP120 kodierenden Bereich enthält, dadurch gekennzeichnet, daß in der V3-Schleife ein 247 bp langes BglII-XbaI-Fragment oder ein 283 bp langes BglII-NheI-Fragment gegen ein verändertes Fragment ausgetauscht ist, und in der V2-Schleife ein 139 bp langes PstI-BclI-Fragment oder ein 339 bp langes PstI-EcoRI-Fragment gegen ein verändertes Fragment ausgetauscht ist, wobei das Fragment/die Fragmente jeweils an mindestens 6 Positionen Inosin, einen Nukleinsäureaustausch oder eine Mutation aufweist/aufweisen.
16. Einzelsträngige Nukleinsäuresequenz, die den für die V2-Schleife kodierenden Bereich und/oder den für die V3-Schleife kodierenden Bereich von GP120 enthält, dadurch gekennzeichnet, daß in der V3-Schleife ein 247 bp langes BglII-XbaI-Fragment oder ein 283 bp langes BglII-NheI-Fragment gegen ein verändertes Fragment ausgetauscht ist, und in der V2-Schleife ein 139 bp langes PstI-BclI-Fragment oder ein 339 bp langes PstI-EcoRI-Fragment gegen ein verändertes Fragment ausgetauscht ist, wobei das Fragment/die Fragmente jeweils an mindestens 6 Positionen Inosin, einen Nukleinsäureaustausch oder eine Mutation aufweist/aufweisen, wobei die Nukleinsäuresequenz zur Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 14 komplementär ist.
17. Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, daß das Fragment/die Fragmente an 9 bis 20 Positionen Inosin, einen Nukleinsäureaustausch oder eine Mutation aufweist/aufweisen.

18. Doppelsträngige DNA, die Hybride der einzelsträngigen Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 15 oder 17 mit der einzelsträngigen Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 16 oder 17 umfaßt.
19. Nukleinsäure-Mischung, die doppelsträngige DNAs umfaßt, deren Nukleinsäuresequenzen von der *env*-Sequenz in SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 11 oder einem Fragment derselben abgeleitet sind, dadurch gekennzeichnet, daß sich die Nukleinsäuresequenzen in dem für die V2-Schleife kodierenden Bereich und/oder in dem für die V3-Schleife kodierenden Bereich jeweils voneinander unterscheiden.
20. Nukleinsäure-Mischung nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß sich die Nukleinsäuresequenz derart voneinander unterscheiden, daß sie für eine Mischung von Proteinen kodieren, die in der V2-Schleife und/oder in der V3-Schleife jeweils voneinander verschiedene Aminosäuresequenzen aufweisen.
21. Nukleinsäure-Mischung nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß die Mischung $\geq 10^2$ Sequenzvarianten enthält.
22. Nukleinsäure-Mischung nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß die Mischung $\geq 10^3$ und vorzugsweise $\geq 10^4$ Sequenzvarianten enthält.
23. Protein-Mischung, die Sequenzvarianten des GP120-Proteins umfaßt, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Mischung von Proteinen ist, die in der V2-Schleife und/oder in der V3-Schleife jeweils voneinander verschiedene Aminosäuresequenzen aufweisen, wobei die Mischung durch Expression einer Plasmid-DNA-Mischung erhältlich ist, die aufgrund der Variation von Nukleotidpositionen zufallsverteilte Sequenzkombinationen aufweist.

- 5 -

24. Protein-Mischung nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß die Mischung $\geq 10^2$ Sequenzvarianten enthält.
25. Protein-Mischung nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß die Mischung $\geq 10^3$ und vorzugsweise $\geq 10^4$ Sequenzvarianten enthält.
26. Plasmid, welches eine doppelsträngige DNA nach Anspruch 18 insertiert enthält.
27. Expressionsvektor, dadurch gekennzeichnet, daß er eine Nukleinsäuresequenz nach den Ansprüchen 9 bis 14 insertiert enthält.
28. Expressionsvektor nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß er die in SEQ ID NO: 10 angegebene Sequenz aufweist.
29. Expressionsvektor, dadurch gekennzeichnet, daß er DSM 12612 entspricht.
30. Vektor-Mischung, die eine Mischung von Plasmiden nach Anspruch 26 enthält, dadurch gekennzeichnet, daß sich die Nukleinsäuresequenzen der Plasmide in dem für die V2-Schleife kodierenden Bereich und/oder in dem für die V3-Schleife kodierenden Bereich jeweils voneinander unterscheiden, wobei die Mischung der Plasmide aufgrund der Variation von Nukleotidpositionen zufallsverteilte Sequenzkombinationen aufweist.
31. Vektor-Mischung nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, daß die Mischung $\geq 10^2$ Plasmide enthält, die sich in ihrer Nukleinsäuresequenz voneinander unterscheiden.
32. Vektor-Mischung nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, daß die Mischung $\geq 10^3$ und vorzugsweise $\geq 10^4$ Plasmide enthält, die sich in ihrer Nukleinsäuresequenz voneinander unterscheiden.

- 6 -

33. Vektor-Mischung nach einem der Ansprüche 30 bis 32, dadurch gekennzeichnet, daß sich die Plasmide in *E. coli* als Wirtszelle exprimieren lassen.
34. Vektor-Mischung nach einem der Ansprüche 30 bis 32, dadurch gekennzeichnet, daß sich die Plasmide in Eukaryontenzellen, vorzugsweise in Cos-, CHO- oder BHK-Zellen, als Wirtszellen exprimieren lassen.
35. *E. coli*-Wirtszellen, die mit einer Vektor-Mischung nach Anspruch 33 transfiziert sind.
36. Eukaryontische Wirtszellen, die mit einer Vektor-Mischung nach Anspruch 34 transfiziert sind.
37. Eukaryontische Wirtszellen nach Anspruch 36, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Wirtszelle aus der Gruppe bestehend aus Cos-, BHK- oder CHO-Zellen ist.
38. Verfahren zur Herstellung der Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß man in eine für ein virales Protein kodierende Nukleinsäuresequenz so viele stille Mutationen einführt, daß die dadurch erhaltene Nukleinsäuresequenz monovalente Restriktionsspaltorte enthält, die den Austausch der V2- und V3-Region ermöglichen.
39. Verfahren zur Herstellung der Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß man in eine für ein virales Protein kodierende Nukleinsäuresequenz so viele stille Mutationen einführt, daß die dadurch erhaltene Nukleinsäuresequenz zehn monovalente Restriktionschnittstellen in Abständen von ca. 150 Basenpaaren enthält.
40. Verfahren nach Anspruch 38 oder 39, dadurch gekennzeichnet, daß die für ein virales Protein kodierende Nukleinsäuresequenz die Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 11 oder ein Fragment derselben ist.

- 7 -

41. Verfahren zur Herstellung der Vektor-Mischung nach den Ansprüchen 33 und 34, dadurch gekennzeichnet, daß man Plasmide, deren Nukleinsäuresequenzen sich in dem für die V2-Schleife kodierenden Bereich und/oder in dem für die V3-Schleife kodierenden Bereich jeweils durch Zufallsverteilung der Basen an den variierten Nukleotidpositionen voneinander unterscheiden, in einen in Wirtszellen exprimierbaren Vektor hineinligiert.
42. Verfahren nach Anspruch 41, dadurch gekennzeichnet, daß die Wirtszellen *E. coli*-, Cos-, CHO- oder BHK-Zellen sind.
43. Verfahren zur Herstellung der Wirtszellen nach Anspruch 35 oder 36, dadurch gekennzeichnet, daß man die Wirtszellen mit einer Vektor-Mischung nach den Ansprüchen 30 bis 32 transformiert.
44. Verfahren zur Herstellung einer Protein-Vakzine nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß man die Wirtszellen nach einem der Ansprüche 35 bis 37 unter Bedingungen kultiviert, die die Expression der Mischung viraler Protein-Sequenzvarianten gestatten.
45. Verfahren zur Herstellung einer DNA-Vakzine nach einem der Ansprüche 4 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß man das Verfahren nach Anspruch 41 oder 42 durchführt, wobei man die erfindungsgemäßen Plasmide in einen Vektor hineinligiert, der in Wirtszellen des zu vakzinierenden Organismus exprimierbar ist.
46. Verwendung einer Mischung strukturell unterschiedlicher viraler Proteine, die Sequenzvarianten eines viralen Proteins oder eines Teils desselben sind zur Herstellung einer Vakzine zur Prävention und/oder Therapie einer Virus-Infektion beim Menschen.

- 8 -

47. Verwendung einer Protein-Mischung nach einem der Ansprüche 23 bis 25 zur Herstellung einer Vakzine zur Prävention und/oder Therapie einer HIV-Infektion beim Menschen.
48. Verwendung einer Mischung von DNA-Molekülen, die für Sequenzvarianten eines viralen Proteins oder eines Teils desselben kodieren zur Herstellung einer Vakzine zur Prävention und/oder Therapie einer Virus-Infektion beim Menschen.
49. Verwendung einer Nukleinsäure-Mischung nach den Ansprüchen 19 bis 22 zur Herstellung einer Vakzine zur Prävention und/oder Therapie einer Virus-Infektion beim Menschen.
50. Verwendung der Nukleinsäure-Mischung nach einem der Ansprüche 19 bis 22 zur Herstellung einer Vektor-Mischung nach einem der Ansprüche 30 bis 32 die in Wirtszellen exprimierbar ist, wobei die Wirtszellen aus der Gruppe bestehend aus *E. coli*-, Cos-, CHO- und BHK-Zellen ausgewählt ist.
51. Verwendung der Vektor-Mischung nach einem der Ansprüche 30 bis 32 zur Expression einer Protein-Mischung nach einem der Ansprüche 23 bis 25.
52. Verwendung der Wirtszelle nach einem der Ansprüche 35 bis 37 zur Herstellung einer Protein-Mischung nach einem der Ansprüche 23 bis 25.
53. Pharmazeutische Zusammensetzung zur Prävention und/oder Therapie einer Virus-Infektion, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Protein-Mischung und eine Nukleinsäuremischung umfaßt, wobei die Protein-Mischung Sequenzvarianten eines viralen Proteins oder eines Teils desselben umfaßt, und die Nukleinsäuremischung DNA-Moleküle umfaßt, die für Sequenzvarianten eines viralen Proteins oder eines Teils desselben kodieren.

- 9 -

54. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 53, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Protein-Mischung nach den Ansprüchen 23 bis 25 und eine Nukleinsäuremischung nach den Ansprüchen 19 bis 22 umfaßt.

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AM DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts P 52348	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 99/ 09759	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 03/12/1999	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 12/02/1999
Anmelder STRATHMANN AG & Co. et al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.
- ☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.
- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das
- ☒ in der internationalen Anmeldung in Schriftlicher Form enthalten ist.
- ☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

- ☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
- ☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

- ☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
- ☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. 1

- ☒ wie vom Anmelder vorgeschlagen ☐ keine der Abb.
- ☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.
- ☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference P 52348	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP99/09759	International filing date (day/month/year) 03 December 1999 (03.12.99)	Priority date (day/month/year) 12 February 1999 (12.02.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/49, C07K 14/16, A61K 39/12, 39/21, C12N 15/85, 1/21, 5/10, A61P 31/18, 31/12		
Applicant STRATHMANN AG & CO.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>6</u> sheets, including this cover sheet. <input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of <u>9</u> sheets.
3. This report contains indications relating to the following items: I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 07 September 2000 (07.09.00)	Date of completion of this report 11 May 2001 (11.05.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP99/09759

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.):

- ☐ the international application as originally filed.
- ☐ the description, pages 1-61, as originally filed,
pages _____, filed with the demand,
pages _____, filed with the letter of _____,
pages _____, filed with the letter of _____.
- ☐ the claims, Nos. _____, as originally filed,
Nos. _____, as amended under Article 19,
Nos. _____, filed with the demand,
Nos. 1-54, filed with the letter of 02 November 2000 (02.11.2000),
Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☐ the drawings, sheets/fig 1/6-6/6, as originally filed,
sheets/fig _____, filed with the demand,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 99/09759

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-18, 23-45, 47, 51-54	YES
	Claims	19 - 22, 46, 48 - 50	NO
Inventive step (IS)	Claims	1-8, 10-18, 23-45, 47, 51-54	YES
	Claims	9, 19 - 22, 46, 48 - 50	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1 - 54	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

1.1 The application describes the use of a mixture of sequence variants of a viral protein for producing neutralizing antibodies. V2 and V3 loops of the HIV gp120 protein serve as examples.

1.2 Novelty (PCT Article 33(2))

The application is based on the concept of combining many different sequence variants of a viral protein in order to imitate the variability of certain antigenic determinants such as is observed in HIV, for example.

A similar concept to that of the present application is also described in US 5 846 546 (D1), in which mixtures of up to 10^4 different recombinant vaccinia viruses are sought, each expressing a different HIV env protein. However, the application describes not only so-called polyenv vaccines based on vaccinia (column 7) but also DNA and protein vaccines (columns 7 and 9). Preferably, the polyenv vaccines contain one or a plurality of variable regions of the env protein (column 25, line 28 to 32). The use of gene cassettes for cloning purposes is described

in columns 27 and 33. The env variants are obtained from patient sera. In one example, 40 different env sequences were combined.

Protein vaccines based on the same principle are also described in Neurath et al., 1991 (D2). A vaccine with 21 different HIV V3 loop peptides was tested on chimpanzees.

A further peptide vaccine based on the same concept was described in FR 2 677 363 (D3, page 2), which describes synthetically produced peptides which are varied on the basis of V3 loop peptides found in patient isolates. Up to 7×10^5 different peptides can be mixed in this context (page 7).

The combinations described in the prior art differ from the vaccines and mixtures defined in Claims 1, 4, 23 and 30 by the way in which the variants are produced. The prior art describes a structural limitation of the possible variants for the HIV V3 loop (e.g. Neurath et al., 1991, Introduction; FR 2 677 363, bottom of page 4). The distribution (see below) of the exchanged amino acids of the mixtures cited in the prior art should therefore not be random, since they proceed from natural isolates. Therefore the subject matter of Claims 1 to 8, 23 to 25, 30 to 37, 41 to 45, 47 and 51 to 54 is considered novel.

The sequences defined in Claims 9 to 18, 26 to 29 and 38 to 40 are not described in the cited prior art.

Claims 19 to 22, 46 and 48 to 50 concern generally defined mixtures of DNA molecules or proteins containing a plurality of sequence variants of a viral protein. Mixtures of this type and their use are described in the above-mentioned prior art.

1.3 Inventive step (PCT Article 33(3))

Proceeding from the prior art described in D1 to D3, the technical problem to be solved is considered to be that of preparing further vaccines offering broad protection against further variants of a given virus. The application solves this problem by random variation of the nucleic acid sequences defined, for example, in Claims 13 and 14. As a result, in contrast to the prior art, variants which have not yet been found in nature are also produced. Since the prior art proceeded from structural restrictions in the production of variants, this solution cannot be derived from said prior art in an obvious manner.

Claim 9 concerns env-derived nucleic acids which contain monovalent restriction interfaces which enable the V2 and V3 regions to be exchanged specifically. WO-A-95/04147 describes a similar construct for exchanging the V3 region (page 8, lines 5 to 10). The IPEA is of the opinion that, if a person skilled in the art provides for the exchange of V2 and V3, the solution proposed in Claim 9 is obvious.

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

- 2.1 The delimiting feature of independent Claims 1, 4, 23 and 30 is the random distribution of the sequence combinations. In order to ascertain whether a protein vaccine contains such a combination, it is necessary to carry out a statistical analysis, which is associated with error probability. The question as to whether a random distribution can be excluded with sufficient certainty even with mixtures having, for example, 100 sequence variants as described in D1, still requires clarification.
- 2.2 Claim 15 concerns env-derived sequences in which certain sequence sections have been exchanged in order, for example, to exchange nucleic acids. Because no reference sequence is specified, it is impossible to ascertain whether such an exchange has taken place.

Patent Claims

1. Protein vaccine which comprises a mixture of viral protein molecules, **characterized in that** the molecules are sequence variants of a single viral protein or of part of same, the mixture containing $\geq 10^2$ sequence variants, which is obtainable by expression of a plasmid-DNA mixture which, because of the variation of nucleotide positions, contains randomly distributed sequence combinations.
2. Protein vaccine according to claim 1, **characterized in that** the mixture contains $\geq 10^3$ and preferably $\geq 10^4$ sequence variants.
3. Protein vaccine according to claim 1 or 2, **characterized in that** it comprises a mixture of GP120 proteins of HIV which in each case differ from each other in their amino acid sequence in the region of the V2 loop and/or of the V3 loop.
4. DNA vaccine which codes for a mixture of structurally different virus proteins, **characterized in that** the vaccine contains a mixture of sequence variants of a viral DNA molecule or of part of same, the mixture containing $\geq 10^2$ DNA molecules which differ from each other in their nucleic acid sequence, where the mixture, because of the variation of nucleotide positions, contains randomly distributed sequence combinations.

5. DNA vaccine according to claim 4, **characterized in that** it contains a mixture of DNA molecules which code for the sequence variants of a viral protein or a part.

Sub A2 6. DNA vaccine according to claim 4 or 5, **characterized in that** the mixture contains $\geq 10^3$ and preferably $\geq 10^4$ DNA molecules which differ from each other in their nucleic acid sequence.

7. DNA vaccine according to one of claims 4 to 6, **characterized in that** it codes for a mixture of structurally different GP120 proteins of HIV, in which the vaccine contains a mixture of DNA molecules, the nucleic acid sequences of which differ from each other in the region coding for the V2 loop and/or in the region coding for the V3 loop.

8. DNA vaccine according to claim 7, **characterized in that** it contains a mixture of DNA molecules which differ from each other in their nucleic acid sequence such that they code for a mixture of GP120 proteins which contain amino acid sequences which differ from each other in the V2 loop and/or in the V3 loop.

9. Nucleic acid sequence which is derived from the env sequence represented in SEQ ID NO: 1 or a fragment of same, **characterized in that** it is modified such that it contains monovalent restriction sites which make possible the specific exchange of the V2 and V3 regions.

10. ✓ Nucleic acid sequence which is derived from the env sequence represented in SEQ ID NO: 1 or a fragment of same, **characterized in that** it is modified such that it contains ten monovalent restriction cleavage sites at intervals of approx. 150 base pairs.
11. Nucleic acid sequence according to claim 9 or 10, **characterized in that** the sequence is modified by the introduction of silent mutations.
12. Nucleic acid sequence according to claims 9 to 11, **characterized in that** it contains the sequence given in SEQ ID NO: 9.
13. ✓ Nucleic acid sequence, **characterized in that** it contains the sequence given in SEQ ID NO: 11.
14. ✓ Nucleic acid sequence, **characterized in that** it contains the sequence given in SEQ ID NO: 12.
15. ✓ Single-stranded nucleic acid sequence which contains the region coding for the V3 loop and/or for the V2 loop of GP120, **characterized in that** in the V3 loop a 247 bp-long BglII-XbaI fragment or a 283 bp-long BglII-NheI fragment is exchanged for a modified fragment, and in the V2 loop a 139 bp-long PstI-BclI fragment or a 339 bp-long PstI-EcoRI fragment is exchanged for a modified fragment, the fragment/the fragments in each case containing inosine, a nucleic acid exchange or a mutation at at least 6 positions.

- 16 ✓ Single-stranded nucleic acid sequence which contains the region coding for the V2 loop and/or the region of GP120 coding for the V3 loop, **characterized in that** in the V3 loop a 247 bp-long BglIII-XbaI fragment or a 283 bp-long BglIII-NheI fragment is exchanged for a modified fragment, and in the V2 loop a 139 bp-long PstI-BclI fragment or a 339 bp-long PstI-EcoRI fragment is exchanged for a modified fragment, the fragment/the fragments in each case containing inosine, a nucleic acid exchange or a mutation at at least 6 positions, the nucleic acid sequence being complementary to the nucleic acid sequence according to claim 14.
17. Nucleic acid sequence according to claim 15 or 16, characterized in that the fragment/the fragments contain(s) inosine, a nucleic acid exchange or a mutation at 9 to 20 positions.
18. Double-stranded DNA which comprises hybrids of the single-stranded nucleic acid sequence according to claim 15 or 17 with the single-stranded nucleic acid sequence according to claim 16 or 17.
- 19 ✓ Nucleic acid mixture which comprises double-stranded DNAs, the nucleic acid sequences of which are derived from the env sequence in SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 11 or a fragment of same, **characterized in that** the nucleic acid sequences in each case differ from each other in the region coding for the V2 loop and/or in the region coding for the V3 loop.

20. Nucleic acid mixture according to claim 19, **characterized in that** the nucleic acid sequences differ from each other such that they code for a mixture of proteins which in each case contain amino acid sequences which differ from each other in the V2 loop and/or in the V3 loop.
21. Nucleic acid mixture according to claim 20, **characterized in that** the mixture contains $\geq 10^2$ sequence variants.
22. Nucleic acid sequence according to claim 21, **characterized in that** the mixture contains $\geq 10^3$ and preferably $\geq 10^4$ sequence variants.
23. Protein mixture which comprises sequence variants of the GP120 protein, **characterized in that** it is a mixture of proteins which contain amino acid sequences which in each case differ from each other in the V2 loop and/or in the V3 loop, the mixture being obtainable by expression of a plasmid DNA mixture which, because of the variation of nucleotide positions, contains randomly distributed sequence combinations.
24. Protein mixture according to claim 23, **characterized in that** the mixture contains $\geq 10^2$ sequence variants.
25. Protein mixture according to claim 24, **characterized in that** the mixture contains $\geq 10^3$ and preferably $\geq 10^4$ sequence variants.

26. Plasmid, which contains an inserted double-stranded DNA according to claim 18.

Sub A5 27. Expression vector, ~~characterized in that~~ it contains an inserted nucleic acid sequence according to claims 9 to 14.

28. Expression vector according to claim 27, ~~characterized in that~~ it contains the sequence given in SEQ ID NO: 10.

29. Expression vector, ~~characterized in that~~ it corresponds to DSM 12612.

30. Vector mixture which contains a mixture of plasmids according to claim 26, ~~characterized in that~~ the nucleic acid sequences of the plasmids differ in each case from each other in the region coding for the V2 loop and/or in the region coding for the V3 loop, where the mixture of the plasmids, because of the variation of nucleotide positions, contains randomly distributed sequence combinations.

31. Vector mixture according to claim 30, ~~characterized in that~~ the mixture contains $\geq 10^2$ plasmids which differ from each other in their nucleic acid sequence.

32. Vector mixture according to claim 31, ~~characterized in that~~ the mixture contains $\geq 10^3$ and preferably $\geq 10^4$

plasmids which differ from each other in their nucleic acid sequence.

Sub A6
33. Vector mixture according to one of claims 30 to 32, characterized in that the plasmids can be expressed in *E. coli* as host cell.

34. Vector mixture according to one of claims 30 to 32, characterized in that the plasmids can be expressed in eukaryotic cells, preferably in Cos, CHO or BHK cells, as host cells.

35. *E. coli* host cells which are transfected with a vector mixture according to claim 33.

36. Eukaryotic host cells which are transfected with a vector mixture according to claim 34.

37. Eukaryotic host cell according to claim 36, characterized in that they are a host cell from the group consisting of Cos, BHK or CHO cells.

38. Process for the preparation of the nucleic acid sequence according to claim 10, characterized in that so many silent mutations are introduced into a nucleic acid sequence coding for a viral protein that the nucleic acid sequence thereby obtained contains monovalent restriction sites which make possible the exchange of the V2 and V3 regions.

39. Process for the preparation of the nucleic acid sequence according to claim 10, characterized in that

so many silent mutations are introduced into a nucleic acid sequence coding for a viral protein that the nucleic acid sequence thereby obtained contains ten monovalent restriction sites at intervals of approx. 150 base pairs.

Sub A7 40. Process according to claim 38 or 39, characterized in that the nucleic acid sequence coding for a viral protein is the sequence according SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 11 or a fragment of same.

41. Process for the preparation of the vector mixture according to claims 33 and 34, characterized in that plasmids, the nucleic acid sequences of which in each case differ from each other in the region coding for the V2 loop and/or in the region coding for the V3 loop in each case through random distribution of the bases at the varied nucleotide positions, are ligated into a vector which can be expressed in host cells.

42. Process according to claim 41, characterized in that the host cells are *E. coli*, Cos, CHO or BHK cells.

Sub A8 43. Process for the preparation of the host cells according to claim 35 or 36, characterized in that the host cells are transformed with a vector mixture according to claims 30 to 32.

44. Process for the preparation of a protein vaccine according to one of claims 1 to 3, characterized in that the host cells are cultivated according to one of claims 35 to 37 under conditions which allow the

expression of the mixture of viral protein sequence variants.

45. Process for the preparation of a DNA vaccine according to one of claims 4 to 8, characterized in that the process is carried out according to claim 41 or 42, the plasmids according to the invention being ligated into a vector which can be expressed in host cells of the organism to be vaccinated.
46. ✓ Use of a mixture of structurally different viral proteins which are sequence variants of a viral protein or of part of same, for the preparation of a vaccine for the prevention and/or therapy of a virus infection in humans.
47. Use of a protein mixture according to one of claims 23 to 25 for the preparation of a vaccine for the prevention and/or therapy of a HIV infection in humans.
48. ✓ Use of a mixture of DNA molecules which code for sequence variants of a viral protein or of part of same, for the preparation of a vaccine for the prevention and/or therapy of a virus infection in humans.
49. Use of a nucleic acid mixture according to claims 19 to 22 for the preparation of a vaccine for the prevention and/or therapy of a virus infection in humans.

50. Use of the nucleic acid mixture according to one of claims 19 to 22 for the preparation of a vector mixture according to one of claims 30 to 32 which can be expressed in host cells, the host cells being selected from the group consisting of *E. coli*, Cos, CHO and BHK cells.
51. Use of the vector mixture according to one of claims 30 to 32 for the expression of a protein mixture according to one of claims 23 to 25.
52. Use of the host cell according to one of claims 35 to 37 for the preparation of a protein mixture according to one of claims 23 to 25.
53. ✓ Pharmaceutical composition for the prevention and/or therapy of a virus infection, **characterized in that** it comprises a protein mixture and a nucleic acid mixture, the protein mixture comprising sequence variants of a viral protein or of part of same, and the nucleic acid mixture comprising DNA molecules which code for sequence variants of a viral protein or of part of same.
54. Sub A9 Pharmaceutical composition according to claim 53, **characterized in that** it comprises a protein mixture according to claims 23 to 25 and a nucleic acid mixture according to claims 19 to 22.